

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jiří Houšť

POROVNÁNÍ METOD PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V LÉČIVÝCH PŘÍPRAVCÍCH

The Comparison of Methods for the Determination of
Riboflavin in Medical Preparations

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2015.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané analytické metody sloužící ke stanovení riboflavinu v určených léčivých přípravcích. Mezi metody, u kterých probíhalo jejich zhodnocení z hlediska pravdivosti, preciznosti a časové náročnosti, byla zařazena spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, spektrofluorimetrie a voltametrie. Jednotlivá stanovení probíhala na pěti různých přípravcích, které se nacházely ve čtyřech lékových formách: tablety, potahované tablety, lyofilizáty pro přípravu infuzního roztoku a sirup. Nejpravdivější výsledky poskytlo spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti, pravým opakem bylo stanovení voltametrické. Nejpreciznější metodou byla spektrofluorimetrie. Časově nejnáročnější se ukázala voltametrie, nejméně času naopak zabralo spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti.

Klíčová slova: riboflavin, UV/VIS spektrofotometrie, fluorimetrie, voltametrie

Poděkování

Tímto odstavcem bych rád poděkoval mému školiteli panu RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., který mi pomohl vypracovat tuto bakalářskou práci díky své trpělivosti a především svými užitečnými radami, kritickými poznámkami a odbornou pomocí.

Poděkování rovněž náleží i panu Ing. Miroslavu Lorenzovi za vysvětlení tvorby organického názvu riboflavinu a panu RNDr. Václavu Červenému, Ph.D., který pomohl objasnit nejasnosti ve statistickém zpracování výsledků.

Nakonec bych rád poděkoval i mým rodičům, jejichž silná podpora mi pomáhá překonat nesnadné chvíle při studiu a dodává mi odvahu nevzdat to.

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	6
1	Cíl bakalářské práce	7
2	Teoretický úvod	8
2.1	Riboflavin	8
2.1.1	Historie objevu riboflavinu	8
2.1.2	Chemické s fyzikálně-chemické vlastnosti riboflavinu	9
2.1.3	Biochemické vlastnosti riboflavinu, jeho funkce a význam	10
2.1.4	Metabolismus riboflavinu	12
2.1.5	Hypovitaminóza, zdroje riboflavinu	13
2.1.6	Farmakologie a toxikologie riboflavinu	15
2.1.7	Metody syntézy riboflavinu	16
2.2	Metody stanovení riboflavinu	17
2.3	Principy vybraných metod pro stanovení riboflavinu	17
2.3.1	Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti	18
2.3.2	Spektrofluorimetrické stanovení	18
2.3.3	Voltametrické stanovení	18
3	Experimentální část	20
3.1	Analyzované léčivé přípravky	20
3.2	Použité chemikálie	20
3.3	Pracovní postupy použitých metod	21
3.3.1	Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti	21
3.3.2	Spektrofluorimetrické stanovení	23
3.3.3	Voltametrické stanovení	26
3.4	Statistické zpracování naměřených hodnot	29
4	Výsledky a diskuze	30
4.1	Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti	30
4.2	Spektrofluorimetrické stanovení	33
4.3	Voltametrické stanovení	35
4.4	Vyhodnocení preciznosti, pravdivosti a dalších aspektů vybraných metod pro stanovení riboflavinu	38
4.5	Použití dalších metod pro stanovení riboflavinu	40
5	Závěr	41
	Literatura	42

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
EGRAC	koeficient aktivity glutathionreduktasy v erytrocytech (erythrocyte glutathione reductase activity coefficient)
F	intenzita fluorescence
FAD	oxidovaný flavinadenindinukleotid
FADH ₂	redukovaný flavinadenindinukleotid
FMN	oxidovaný flavinmononukleotid
FMNH ₂	redukovaný flavinmononukleotid
GSH	redukovaný glutathion
GSSH	oxidovaný glutathion
LAB	bakterie mléčného kvašení (lactic acid bacteria)
<i>m</i>	hmotnost [mg]
<i>M</i>	molární hmotnost [g mol ⁻¹]
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
SFLM	spektrofluorimetrie
UV/VIS	spektrofotometrie v UV/VIS oblasti
<i>V</i> _{kal.}	objem odměrné baňky kalibrační řady [ml]
<i>V</i> _{zás.}	objem odměrné baňky se zásobním roztokem léčivého přípravku [ml]
VOLT	voltametrie
<i>V</i> ₁	objem léčivého přípravku v kalibrační řadě [ml]
<i>V</i> ₂	objem odměrné baňky k naředění vzorku [ml]
/ <i>x</i> /	absolutní hodnota molární koncentrace [M]
<i>w</i>	obsah složky ve vzorku [hmotnostní %]
λ	vlnové délka [nm]

1 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je porovnání a zhodnocení celkem tří analytických metod pro stanovení obsahu riboflavinu v pěti léčivých přípravcích nacházejících se ve třech lékových formách (tablety, lyofilizáty pro přípravu injekčních roztoků a sirup). U vybraných analytických metod (spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, spektrofluorimetrie, voltametrie) byla porovnávána jejich pravdivost, preciznost a časová náročnost.

2 Teoretický úvod

2.1 Riboflavin

2.1.1 Historie objevu riboflavinu

Za objevitele riboflavinu je považován anglický chemik Alexandr Wynter Blyth (1844 až 1921), který v roce 1872 objevil v kravském mléce žlutozelený pigment, jenž nazval laktochrom [1, 2].

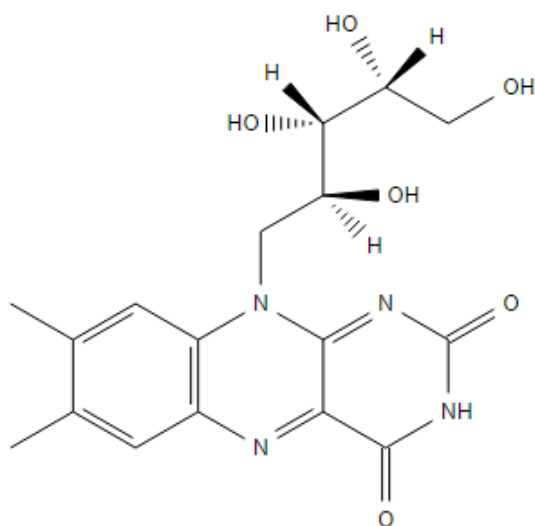
O šedesát let později, v roce 1932 se německý lékař Otto Heindrich Warburg (1883–1970) detailně zabýval asimilací oxidu uhličitého v rostlinách, metabolismem nádorů a chemickými složkami uplatňovaných při přenosu kyslíku během fermentace, při čemž znovu objevil „žlutý ferment“. V roce 1931 získal Warburg Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu, konkrétně „za objev povahy a způsob účinku dýchacího enzymu“ [3].

V následujícím roce, 1933, německý biochemik rakouského původu Richard Kuhn (1900–1967) jako první na světě izoloval čistý riboflavin na žádost amerického pediatra Paula Györgyho. Izolace byla velmi náročná, neboť na jeden gram čistého riboflavinu připadlo více než 5000 litrů mléka nebo 34 000 vajec, ze kterých byl riboflavin izolován; odtud pochází i další názvy pro riboflavin: laktoflavin a ovoflavin. Kuhn si, vzhledem k obdobným vlnovým délkám spektrálních absorpčních maxim, uvědomil souvislost mezi riboflavinem a flaviny. Proto vyřešil i otázku toho, jestli je riboflavin vitamín nebo jen prekurzor. K objasnění mu pomohl degradační produkt riboflavinu lumiflavin. Kuhn dokázat lumiflavin vykrystalizovat a díky objasnění jeho struktury byl schopen syntetizovat riboflavin, u kterého určil jeho strukturu. Tím dokázal, že riboflavin není prekurzor, ale vitamín. Nositelem Nobelovy ceny za chemii se stal v roce 1939 „za práci na karotenoidech a vitamínech“ [4].

V roce 1935 pak švýcarský chemik Paul Karrer (1889–1971) poprvé syntetizoval riboflavin a dále objasnil, že flavinový komplex není pouze riboflavin, ale že je jeho součástí. V roce 1937 obdržel Nobelovu cenu za chemii „za výzkum karotenoidů, flavinů, vitamínu A a vitamínu B₂“ [5].

2.1.2 Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti riboflavinu

Molekula riboflavinu (obr. 2.1) se skládá ze dvou částí [6, 7]. První částí je isoalloxazin, systematicky benzo[*g*]pteridin-2,4(3*H*,10*H*)-dion, který tvoří tautomerní pár s alloxazinem, systematicky benzo[*g*]pteridin-2,4(1*H*,3*H*)-dionem. Isoalloxazinové jádro v molekule riboflavinu má navíc v poloze 7 a 8 dvě methylové skupiny. Druhou částí molekuly riboflavinu je cukerný alkohol D-ribitol vzniklý redukcí aldehydové skupiny monosacharidu D-ribózy. Cukerný alkohol D-ribitol obsahuje tři chirální uhlíky, systematický název je tedy 2*S*,3*S*,4*R*-1,2,3,4,5-pentahydroxypentan a na isoalloxazin se napojuje přes dusík v poloze 10. Systematický název riboflavinu je tedy 7,8-dimethyl-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[*g*]pteridin-2,4(3*H*,10*H*)-dion. Triviální název je odvozen zkrácením slov ribitol a latinského názvu pro žlutou barvu *flavus*.



Obr. 2.1 Chemická struktura riboflavinu

Sumární vzorec riboflavinu je $C_{17}H_{20}N_4O_6$, riboflavin má molekulovou hmotnost 376,369 g mol⁻¹, jeho hustota je při 20 °C 1,65 g cm⁻³, hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol/voda je -1,5 a hodnoty pK_a jsou 1,9 a 10,2 při teplotě 20 °C [6, 7].

Riboflavin je žlutý nebo žluto-oranžový krystalický prášek bez zápachu s hořkou chutí, velmi těžce rozpustný ve vodě ($2,88 \times 10^{-4}$ M při teplotě 25 °C [8]), prakticky nerozpustný v acetonu, chloroformu, etheru a 96% ethanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů nebo v roztocích silných kyselin. Bod tání riboflavinu se pohybuje v rozmezí od 278 °C do 282 °C, při této teplotě dochází i k jeho rozkladu.

Roztok riboflavinu vykazuje v ultrafialové oblasti silnou fluorescenci, kterou zhasí přídavek minerálních kyselin, alkálií nebo redukčních látek (např. dithioničitan sodný). Absorpční maxima riboflavinu jsou v ultrafialové oblasti pozorovatelná při vlnových délkách 223, 267, 373 a 444 nm. Riboflavin se ve vodném roztoku rozkládá působením ultrafialového nebo viditelného světla. Fotodegradací v alkalickém prostředí vzniká lumiflavin, systematicky 7,8,10-trimethylisoalloxazin, v kyselém prostředí vzniká lumi-chrom, systematicky 7,8-dimethylalloxazin. Oba dva produkty fotodegradace jsou biologicky neaktivní [10].

2.1.3 Biochemické vlastnosti riboflavinu, jeho funkce a význam

Riboflavin (vitamín B₂) je hydrofilní vitamín, jenž je součástí B-komplexu. V lidském těle se nachází ve velmi malém množství ve volné formě nebo po fosforylaci jako koenzym flavoproteinů ve formách flavinmononukleotid (FMN; riboflavin-5'-fosfát) a flavinadenindinukleotid (FAD) [9].

Riboflavin se fosforyluje fosfátem z adenosintrifosfátu (ATP) za současné katalýzy enzymu flavokinasy. Minoritní část FMN je přímo užita jako koenzym, majoritně podléhá FMN další reakci s molekulou ATP za vzniku FAD katalyzované FAD-pyrofosforylasou. Výše popsany sled reakcí je vratný, pochopitelně za využití jiných enzymů: pyrofosfatasy a FMN-fosfatasy. Syntéza flavinových koenzymů je kontrolována a regulována thyroideálními hormony, které především regulují aktivitu flavinových biosyntetických enzymů a syntézy flavoproteinových apoenzymů [10].

Flavinmononukleotid a FAD obsahující riboflavin mají funkci prostetických skupin, které se spojují se specifickými proteiny, které se formují do aktivních enzymů flavoproteinů. Nejvíce flavoproteinů obsahuje FAD. Riboflavin se v těchto koenzymech zapojuje do metabolismu jako přenašeč elektronů v biologických oxidačně-redukčních reakcích. Hlavní funkcí flavoproteinů je oxidace substrátu a generování energie ve formě ATP. Mnoho flavoproteinů obsahuje ve své molekule kov, např. železo, molybden, měď a zinek. Skoro čtyřicet flavoproteinových enzymů se účastní přenosu elektronů z metabolitů a pyridinových nukleotidů na molekulární kyslík. Flavoproteiny obsahující FAD jsou nezbytné při oxidaci mastných kyselin, naopak k syntéze mastných kyselin z acetátu je zapotřebí flavoproteiny obsahující FMN [11].

Koenzymy FMN a FAD jsou důležitou součástí intermediárního metabolismu. Nejvíce flavoproteinů používá jako koenzym raději FAD než FMN z důvodu větší rozmanitosti metabolických reakcí. V citrátovém cyklu se při přeměně sukcinátu na fumarát uvolní dva elektrony a dva protony, které přijme FAD (konkrétně na dusíky v poloze 1 a 10 isoalloxazinového jádra), jenž je pevně navázán v sukcinát-Q-reduktasovém komplexu (komplex II) dýchacího řetězce. Komplex II je součástí vnitřní mitochondriální membrány a FAD, které přijme výše zmíněné protony a elektrony, se zredukuje na FADH_2 . Elektrony jsou následně předány oxidoredukčním Fe-S skupinám, které jsou ještě součástí komplexu II. Dva elektrony nakonec přijímá koenzym Q. Koenzym FADH_2 není redukován pouze v citrátovém cyklu, ale tvoří se spolu s fungováním glycerolfosfátového člunku, při β -oxidaci mastných kyselin, při biosyntéze ceramidu nebo je jeho tvorba spojena s metabolismem aminokyselin threoninu, lysinu, valinu, leucinu a isoleucinu. S dýchacím řetězcem je spojen i koenzym FMN, který je součástí NADH-Q-oxidoreduktasového komplexu (komplex I). Flavinmononukleotid přijme dva elektrony a dva protony z NADH, vznikne FMNH_2 , který předá elektrony Fe-S skupinám. Tyto skupiny nakonec předají elektrony další navázané části komplexu I, koenzymu Q, který elektrony předá volnému ubiquinonu, jenž se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně [9,10].

2.1.4 Metabolismus riboflavinu

Lidé přijímají riboflavin v potravinách, kde je nejvíce zastoupen ve formě jeho koenzymů. Volný riboflavin je do těla dodáván pomocí multivitaminových přípravků.

Proces absorpce riboflavinu probíhá v tenkém střevě a zahrnuje proces defosforylace a refosforylace. V tenkém střevě jsou koenzymy FMN a FAD defosforylovány na volný riboflavin, který může projít skrz sliznici tenkého střeva do krve. Proces absorpce zahrnuje aktivní ATPasový transportní systém, a pokud je koncentrace riboflavinu ve střevě nízká, je absorpce navíc závislá i na sodných kationtech. Při vysokých koncentracích riboflavinu v tenkém střevě prochází skrz lumen pasivní difúzí. Přítomnost žlučových solí urychluje absorpci riboflavinu. Refosforylace volného riboflavinu na FMN pomocí flavokinasy a ATP nastává při průchodu sliznicí tenkého střeva.

Transport volného riboflavinu nebo koenzymu FMN v krvi je možný pomocí vazby na albumin. Toto spojení ovšem brzy zaniká a vzniká nové, mezi riboflavinem nebo FMN a imunoglobuliny třídy A, G a M. V tomto spojení je riboflavin nebo FMN dopraven do cílových tkání, ve kterých dojde k přeměně FMN na FAD pomocí enzymu FAD-pyrofosfatasy a další molekuly ATP. Přeměna riboflavinu na jeho koenzymy je regulována a kontrolována thyroideálními hormony. Mezi další regulátory můžeme řadit aldosteron a adrenokortikotropní hormon, které urychlují tvorbu flavinů z riboflavinu.

Největší koncentrace flavinů nacházíme v játrech, kde je až jedna třetina všech flavinů v těle, dále v ledvinách a srdci. Největší podíl má v lidském těle FAD (70–90 %), nejméně volný riboflavin (< 5 %), jehož nejvyšší koncentrace je v sítnici oka.

Exkrece riboflavinu a jeho koenzymů probíhá do moči. Ledviny vylučují do moči pouze volný riboflavin a FMN, jehož defosforylace probíhá v močovinovém měchýři. Zhruba 60–70 % všech sloučenin obsahujících riboflavin se vyloučí právě jako riboflavin, zbytek tvoří deriváty vzniklé z kovalentně navázaných flavoproteinů a intestinální degradací riboflavinu díky mikroorganismům. Jedná se především o 7-hydroxymethylriboflavin, 8 α -sulfonylriboflavin, 8-hydroxymethylriboflavin a 10-hydroxyethylflavin. V moči byly objeveny i stopy lumiflavinu.

Poruchy metabolismu riboflavinu pozorujeme u chronických alkoholiků, neboť alkohol interferuje při absorpci riboflavinu do krve. Dále tvoří riboflavin a FMN cheláty především s mědí, zinkem a železem, a komplexy s léky, kofeinem, theofylinem, sacharinem, nikotinamidem, askorbovou kyselinou, tryptofanem a močovinou. Zajímavostí je tvorba komplexu s kyselinou boritou, která tvoří komplex se sloučeninami obsahující mnoho hydroxy skupin, mimo riboflavin i s glukózou, askorbovou kyselinou aj. Vzhledem k tomu, že kyselina boritá zrychluje exkreci riboflavinu, bylo u hlodavců pozorováno, že po umělé expozici hlodavce kyselině borité snížily následně dodané dávky riboflavinu toxicitu této kyseliny. U lidí toto nefunguje z důvodu malé rozpustnosti riboflavinu a jeho limitované absorpce ze střev [10, 11].

2.1.5 Hypovitaminóza, zdroje riboflavinu

Hypovitaminóza riboflavinu je vždy spojena s hypovitaminózou dalších vitamínů skupiny B, neboť příjem riboflavinu je spojen s konzumací zelené listové zeleniny a mléčných produktů, především mléka a vajec. Hypervitaminóza není za běžných okolností možná z důvodu vyloučení nadměrného množství přijatého riboflavinu do moči.

Deficit riboflavinu je primárně způsoben jeho nedostatečným příjmem v potravinách. Jeho trávení a absorpce z tenkého střeva mohou být navíc narušeny alkoholem. Mezi další příčiny hypovitaminózy patří abnormality v nadledvinách, nedostatečnost thyroideálních hormonů, chemoterapie a podávání léků na malárii. Mezi další léky vyvolávající deficitní stavy riboflavinu díky podobné struktuře molekuly patří antipsychotikum chlorpromazin a tricyklická antidepresiva imipramin a amitriptylin, jenž inhibují flavokinasu.

Počátky nedostatku riboflavinu se projeví poklesem jeho koncentrace v krvi na téměř nedetegovatelnou úroveň. Takto se šetří koenzymy FMN a FAD. Dalším významným rysem je zvýšení syntézy redukovaného glutathionu GSH *de novo* z jeho aminokyselinových prekurzorů. Při normálním stavu se oxidovaný glutathion GSSH redukuje na GSH pomocí enzymu glutathionreduktasy, která vyžaduje FAD.

Při nedostatku riboflavinu se tento proces omezí a GSH vzniká jako produkt cysteinu, glutamátu a glycinu za katalýzy enzymu glutathionsynthetasy.

Mezi rané příznaky hypovitaminózy u lidí řadíme celkovou slabost, únavu, pálení a svědění očí. Později se objevuje vypadávání vlasů a ochlupení, různé typy dermatitid, světloplachost, vaskulizace rohovky, tvorba šedého zákalu, keratokonus s tvorbou kónické rohovky, pálení rtů, úst a jazyka, zánět ústních koutků spojený s jejich praskáním, zánět jazyka spojený se snížením citlivosti na chutě, anémie, degenerativní změny v nervové soustavě a dysfunkce mozku. Rané příznaky se dají velmi snadno léčit dodáním riboflavinu, komplikace vyvolané při dlouhodobější hypovitaminóze se musí léčit komplexněji s delším časovým intervalem. Těžký deficit riboflavinu může postihnout konverzi vitamínu B₆ na jeho aktivní koenzym.

Riboflavin je syntetizován zelenými rostlinami, houbami, droždím a některými bakteriemi. Nejlepšími zdroji tohoto vitamínu pro člověka jsou ze zvířat játra, srdce, ledviny, mléko, vejce a sýr, z rostlinné stravy především brokolice, tuřín, listy špenátu a vojtěška. Obecně je ovoce a zelenina dobrým zdrojem, nicméně konzumace nepokryje denní potřebu riboflavinu. Větší biodostupnost je pozorována u zvířecích produktů. Obsah riboflavinu se v jeho zdrojích může zmenšovat. Příkladem může být uchování mléka v lahvi z čirého skla – takto uchované mléko je vystaveno světlu, díky němuž ubývá koncentrace jak riboflavinu, tak i vitamínu A. Dalším příkladem je umělé přidávání hydrogenuhličitanu sodného do zelené zeleniny podporující fotodegradaci riboflavinu nebo sušení ovoce a zeleniny na slunci. Nejvíce riboflavinu najdeme v suchém pekařském droždí (5,41 mg/100 g), jehněčích játrech (5,11 mg/100 g) a v pivovarském droždí (resp. kvasnicích; 5,06 mg/100 g).

Požadavky na příjem riboflavinu se během života mění, obecně jsou závislé na věku, pohlaví, těhotenství a kojení, celkovém zdraví, okolním prostředí, fyzické vyspělosti a aktivitě. Požadavky na příjem riboflavinu jsou ovlivněny užíváním léků a alkoholu, aktivitou thyroïdních hormonů a expozicí těžkými kovy. Alkohol může bránit utilizaci FAD ze stravy, těžké kovy dvojmocného charakteru tvoří cheláty s riboflavinem a FMN, hyperthyroidismus snižuje absorpci riboflavinu ze střev, u hypothyroidismu je tomu naopak. Zvýšenou exkreci do moči pozorujeme u diabetiků, lidé trpící Crohnovou chorobou mají koncentraci riboflavinu v krvi významně sníženou. Pravidelné cvičení zvyšuje nárok na příjem riboflavinu [10, 11]. Doporučená denní dávka se u kojenců

pohybuje v rozmezí 0,4–0,5 mg/den, u dětí 0,8–1,2 mg/den, u dospělých 1,3–1,8 mg/den [12].

Mezi nejužívanější metody pro stanovení hladiny riboflavinu v organismu řadíme stanovení vyloučeného riboflavinu do moči a stanovení EGRAC (erythrocyte glutathione reductase activity coefficient – koeficient aktivity glutathionreduktasy v erythrocytech). Stanovení vyloučeného riboflavinu v moči je však nepřesné, proto se raději používá stanovení EGRAC, jehož principem je zjištění stupně saturace glutathionreduktasy koenzymem FAD. Jedná se o poměr enzymové aktivity glutathionreduktasy s přidavkem FAD a bez jeho přidavku *in vitro*. Hodnoty vyšší než 1,4 ukazují na hypovitaminózu, hodnoty rovné nebo menší 1,2 tento stav zcela vylučují. Hodnota EGRAC může být ovlivněna vrozenou poruchou glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, která je spojena s hemolytickou anémií zvyšující afinitu glutathionreduktasy k FAD, nebo nesprávnou funkcí thyroideálních hormonů [10, 11].

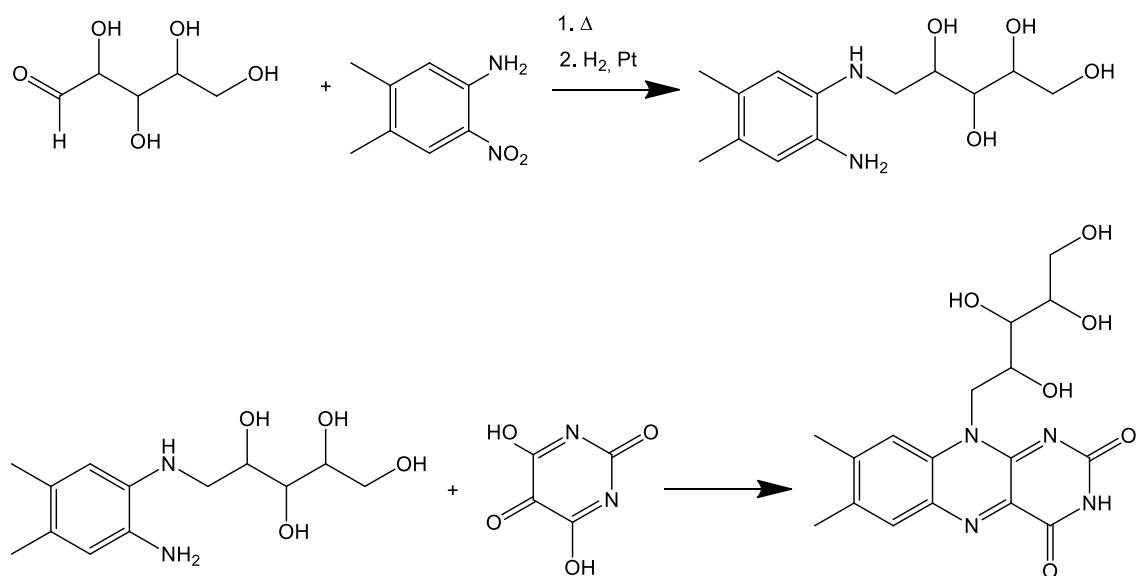
2.1.6 Farmakologie a toxikologie riboflavinu

Za běžných okolností se riboflavinem nejde předávkovat. Při jeho nadměrném orálním příjmu se pouze velmi malá část z této dávky absorbuje do krve, zbytek je vyloučen stolicí. Limitujícím faktorem absorpce riboflavinu z tenkého střeva do krve je nasycení transportního systému pro riboflavin. Lehce toxické účinky byly pozorovány u krys, jimž byl riboflavin podán intraperitoneálně v dávce vyšší než 600 mg/kg.

Pozornost si spíše zaslouží fotosenzitibilní vlastnosti riboflavinu. Různé druhy fototerapií mohou vést k degradaci DNA a ke zvýšení lipoperoxidace, jenž může zavdat vzniku karcinogeneze a mutageneze. Zvýšení aktivity karcinogenů, především nitrosaminů, vedoucí ke karcinogenezi, je způsobeno deficitem riboflavinu v lidském těle. Aplikováním riboflavinu do kůže se může stimulovat vznik volných radikálů podporující nadbytečný vznik melaninu. Degradace DNA a tvorba radikálů je také spojena s reakcí riboflavinu s chromátem za vzniku jejich komplexu, naopak zlepšení ochrany DNA bylo pozorováno ve spojení riboflavinu jako koenzymu s různými enzymy cytochromů P450. Nežádoucí je tvorba aduktu riboflavinu s tryptofanem s následnou podporou jeho fotooxidace [10, 11].

2.1.7 Metody syntézy riboflavinu

Riboflavin lze připravit synteticky, nicméně častější jsou výroby fermentací. Příkladem syntetické výroby (obr. 2.2) je reakce monosacharidu ribosy a 4,5-dimethyl-2-nitroanilinu, který se zredukuje na diamin. Takto vzniklá Schiffova báze kondenzuje s alloxanem a výsledným produktem je riboflavin [13].



Obr. 2.2 Schéma průmyslové syntézy riboflavinu (podle [13]).

Biosyntéza riboflavinu byla popsána u grampozitivních i gramnegativních bakterií, např. *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Pro průmyslovou výrobu riboflavinu pomocí fermentace se ovšem využívá bakterií mléčného kvašení (LAB – lactic acid bacteria). Bakterie mléčného kvašení jsou skupinou mikroorganismů, které se využívají jako kultury pro zpracování kvašeného jídla. Jsou velmi často používány jako probiotika, mohou zvyšovat bezpečnost, trvanlivost, nutriční hodnotu, chuť a celkovou kvalitu fermentačních produktů. Některé kmeny LAB jsou schopné produkovat, uvolňovat a zvyšovat množství prospěšných látek v potravinách. K výrobě riboflavinu fermentací se využívají rody *Streptococcus* a *Enterococcus*. Podmínkou pro efektivní produkci riboflavinu fermentací je příprava kvalitního fermentačního média [1].

2.2 Metody stanovení riboflavinu

Existuje řada metod pro stanovení samotného riboflavinu, pro jeho stanovení ve směsích s dalšími vitamíny nebo pro jeho stanovení v potravinách nebo v nápojích. Mezi takové metody řadíme spektrofotometrii v UV/VIS oblasti, spektrofluorimetrii, voltametrii, planární a kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu.

Voltametrická stanovení lze řadit mezi ta nejčastější díky oxidoredukční schopnosti riboflavinu. Stanovení lze provádět na různých pracovních elektrodách, například na elektrochemicky aktivované elektrodě ze skelného uhlíku [14], na statické rtuťové kapkové elektrodě [15] nebo na obnovitelné prstencové elektrodě ze stříbrného amalgámu [16]. Vedle přímé voltametrie se ke stanovení používá i adsorpční rozpouštěcí voltametrie [15], která může být použita i v módu square wave [17].

Stanovení spektrofotometricky v UV/VIS oblasti lze využít i pro další vitamíny rozpustné ve vodě [18], v praxi se toto stanovení může použít například ke stanovení v energetických nápojích [19]. Stanovení více ve vodě rozpustných vitamínů včetně riboflavinu lze provést i kapilární elektroforézou [20].

Vedle stanovení riboflavinu spektrofluorimetrií [21] se fluorescenční vlastnost riboflavinu hojně využívá jako metoda jeho detekce například ve spojení s kapalinovou chromatografií [22]. Fluorescenční detekce riboflavinu se používá pro jeho stanovení v krvi, plazmě nebo v séru ve spojení s HPLC. V moči se riboflavin deteguje fluorimetricky opět ve spojení s HPLC [6].

2.3 Principy vybraných metod pro stanovení riboflavinu

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány celkem tři metody pro stanovení obsahu riboflavinu v léčivých přípravcích, a to UV/VIS spektrofotometrie, spektrofluorimetrie a voltametrie.

2.3.1 Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti

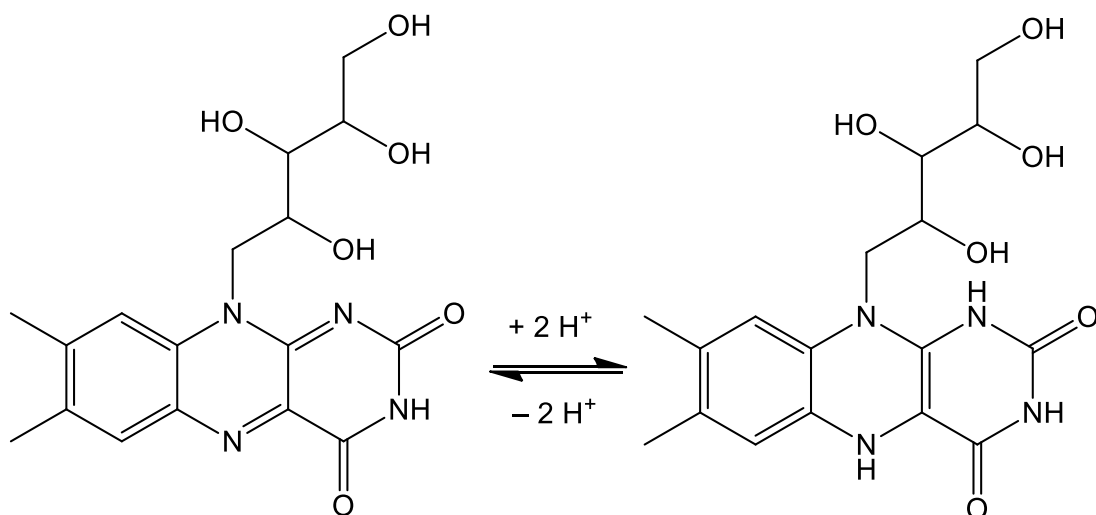
Spektrofotometrické stanovení obsahu riboflavinu bylo provedeno podle *Českého lékopisu 2007* [7]. Principem je měření absorpance vzorku v roztoku hydroxidu sodného a octanu sodného při vlnové délce 444 nm.

2.3.2 Spektrofluorimetrické stanovení

Spektrofluorimetrické stanovení riboflavinu je založeno na měření intenzity fluorescence vyvolané vhodnou excitační vlnovou délkou dopadajícího záření s následným měřením fluorescence při určené emisní vlnové délce vyzařovaného záření. Podle [21] má vhodná excitační vlnová délka hodnotu 450,0 nm a hodnota emisní vlnové délky hodnotu 520,8 nm.

2.3.3 Voltametrické stanovení

Voltametrické stanovení riboflavinu je založeno na jeho oxidačně redukčních vlastnostech podle obr. 2.3.



Obr. 2.3 Oxidačně-redukční vlastnosti riboflavinu.

Oxidovaná forma riboflavinu se příjmem dvou protonů a dvou elektronů na dusíky na pozicích 1 a 5 isoalloxazinového jádra změní na redukovanou formu při určité hodnotě potenciálu. Díky tomuto procesu dojde k depolarizaci pracovní elektrody, kterou začne téci proud. Velikost tohoto katodického proudu je mírou koncentrace riboflavinu. Vrchol potenciálového píku lze očekávat podle [15] kolem hodnoty potenciálu $-0,56$ V, kde měření probíhalo proti referenční argentchloridové elektrodě.

3 Experimentální část

3.1 Analyzované léčivé přípravky

Pro stanovení obsahu riboflavinu vybranými metodami byly použity léčivé přípravky:

1. tablety Riboflavin Generica 10 mg, GENERICA spol. s r. o., Slovenská republika, číslo šarže 06140202, minimální trvanlivost do 30.6.2017,
2. potahované tablety Duovit 1,2 mg, Krka, Slovinsko, číslo šarže L73073, minimální trvanlivost do 20.1.2017,
3. lyofilizovaný prášek pro přípravu injekčního roztoku Cernevit 4,14 mg, BAXTER CZECH spol. s r. o., Česká republika, číslo šarže LE14C043, použitelné do 03/2016,
4. lyofilizovaný prášek pro přípravu injekčního roztoku Soluvit N 3,6 mg, Fresenius Kabi AB, Švédsko, číslo šarže 10HG8175, použitelné do 09/2015,
5. sirup Sanostol 2 mg/10 ml, Takeda GmbH, Německo, číslo šarže 240785, použitelné do 02/2016.

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické (nebo lékopisné) čistoty: hydroxid sodný (Penta), chlorid draselný (Lachema), trihydrát octanu sodného (Fluka), octová kyselina 99% (Penta), riboflavin (Sigma-Aldrich).

3.3 Pracovní postupy použitých metod

3.3.1 Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok riboflavinu byl připraven odvážením asi 95 mg riboflavinu přesně, který byl kvantitativně převeden do 500,0 ml odměrné baňky. Do této odměrné baňky bylo pipetováno 10,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 5,00 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou a zabalena do alobalu. Koncentrace riboflavinu v tomto zásobním roztoku byla $5,00 \times 10^{-4}$ M.
2. Zásobní roztok hydroxidu sodného byl připraven odvážením 8,5 g hydroxidu sodného a jeho rozpuštěním ve 100 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Koncentrace hydroxidu sodného v tomto zásobním roztoku činila 2,1 M.
3. Zásobní roztok octanu sodného byl připraven navážením 0,7 g trihydrátu octanu sodného a rozpuštěním této navážky v 50 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Octan sodný měl koncentraci 0,1 M.

Stanovení

Ke spektrofotometrickému stanovení v UV/VIS oblasti byl použit jednopaprskový spektrofotometr HP 8453 s diodovým polem firmy Hewlett Packard s nanometrovým rozlišením. Měření probíhalo v kyvetě o optické dráze 1,00 cm, absorpční spektrum bylo proměřováno od 200 do 800 nm.

Stanovení obsahu riboflavinu v jednotlivých lékových formách bylo provedeno metodou standardního přídatku, k sestrojení kalibrační přímky byly použity hodnoty absorbancí při 444 nm. Přípravy roztoků analyzovaných léčivých přípravků se částečně lišily:

1. Riboflavin Generica: jedna tableta byla umístěna do 50,00 ml odměrné baňky, do které bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 0,50 ml.

2. Duovit: jedna tableta byla umístěna do kádinky s trochou destilované vody a tato kádinka byla vložena do ultrazvukové lázně na 15 minut. Ultrazvuk tuto tabletu dokonale rozbil a obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Do této baňky bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou na objem 50,00 ml. Takto připravený roztok byl přefiltrován nejprve přes filtrační papír a poté přes filtry Minisart RC 15 s póry o průměru 0,45 nm. Z takto připraveného roztoku byly pipetovány do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 4,00 ml.
3. Cernevit: lyofilizovaný obsah ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 25,00 ml odměrné baňky. Do této baňky byl přidán 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku bylo pipetováno 0,50 ml tohoto roztoku.
4. Soluvit N: lyofilizovaný obsah jedné ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 25,00 ml odměrné baňky, do které bylo následně pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z tohoto roztoku bylo do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetováno 0,60 ml.
5. Sanostol: sirup byl odměřen do 10,00 ml odměrné baňky až po rysku, tento objem byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Po přídatku 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny a doplnění po rysku destilovanou vodou, byla vzniklá směs přefiltrována přes fritu S3 s pomocí podtlaku. Z filtrátu byly pipetovány do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 4,00 ml.

Při metodě standardního přídatku bylo používáno vždy šest roztoků kalibrační řady. Do každé odměrné baňky o objemu 10,00 ml byl pipetován jiný objem zásobního roztoku riboflavinu tak, aby se v následující odměrné baňce nacházela vyšší koncentrace riboflavinu než v předchozí. První baňka sloužila jako slepý pokus a zásobní roztok riboflavinu neobsahovala. Následující baňky obsahovaly zásobní roztok riboflavinu o objemu 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 a 0,50 ml. Do všech odměrných baněk byl

následně pipetován výše uvedený objem roztoku daného léčivého přípravku a 175 µl roztoku octanu sodného. Všechny baňky byly nakonec doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

Vyhodnocení

Obsah riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích byl vypočítán z kalibrační závislosti s ohledem na ředění vzorku během měření:

$$m = |x|MV_{kal.} \frac{V_{zás.}}{V_1} \quad (3.1)$$

kde m je hmotnost riboflavinu vypočítaná z rovnice kalibrační přímky v miligramech [mg], $|x|$ je absolutní hodnota molární koncentrace [M] riboflavinu v roztoku vypočtená z rovnice regrese grafu závislosti absorbance na koncentraci standardního přídatku, M je molární hmotnost riboflavinu [376,367 g mol⁻¹], $V_{kal.}$ je objem odměrné baňky kalibrační řady [ml], $V_{zás.}$ je objem odměrné baňky, do které byl připraven původní roztok léčivého přípravku [ml], V_1 je objem léčivého přípravku pipetovaný do kalibrační řady [ml].

3.3.2 Spektrofluorimetrické stanovení

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok riboflavinu byl připraven odvážením asi 95 mg riboflavinu přesně, který byl kvantitativně převeden do 500,0 ml odměrné baňky. Do této odměrné baňky bylo pipetováno 10,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 5,00 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou a zabalena do alobalu. Koncentrace riboflavinu v zásobním roztoku měla hodnotu $5,00 \times 10^{-4}$ M.
2. Zásobní roztok hydroxidu sodného byl připraven odvážením 8,5 g hydroxidu sodného a jeho rozpuštěním ve 100 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Koncentrace hydroxidu sodného v tomto zásobním roztoku činila 2,1 M.

3. Zásobní roztok octanu sodného byl připraven navážením 0,7 g trihydrátu octanu sodného a rozpuštěním této navážky v 50 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Octan sodný měl koncentraci 0,10 M.

Stanovení

Ke spektrofluorimetrickému stanovení byl použit spektrofluorimetr Luminiscence Spectrometer, AMINCO – Bowman® Series 2 od firmy Thermo Spectronic. K zobrazení a k optimalizaci podmínek měření byl použit počítačový program AB2 Luminescence Spectrometer, ver. 5.50 (Thermo Electron).

Pro zjištění adekvátní odezvy intenzity fluorescence byla připravena kalibrační řada zásobního roztoku riboflavinu do pěti odměrných baněk o objemu 10,00 ml. První banka sloužila jako slepý vzorek, ve zbylých čtyřech byla koncentrace riboflavinu 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} a 2×10^{-5} M. Do všech baněk bylo automatickou pipetou přidáno 175 μ l roztoku octanu sodného, baňky byly doplněny po rysku destilovanou vodou. U vzorku s koncentrací riboflavinu 1×10^{-6} M byla proměřena excitační vlnová délka od 250 nm do 500 nm a emisní vlnová délka od 450 nm do 550 nm za současného měření intenzity fluorescence při citlivosti detektoru 600 V. Na základě tohoto měření byly podmínky dalších měření zvoleny tak, že vlnová délka excitačního záření měla hodnotu 465 nm a vlnová délka emisního záření byla 525 nm; citlivost detektoru byla nastavena na 600 V.

Stanovení obsahu riboflavinu v jednotlivých lékových formách bylo provedeno metodou standardního přídatku, k sestrojení kalibrační přímky byly použity hodnoty fluorescence při vlnové délce emisního záření 525 nm. Přípravy roztoků analyzovaných léčivých přípravků byly následující:

1. Riboflavin Generica: jedna tableta byla umístěna do 50,00 ml odměrné baňky, do které bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná banka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku bylo do 10,00 ml odměrné baňky pipetováno 1,00 ml, banka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 0,40 ml.
2. Duovit: jedna tableta byla umístěna do kádinky s trochou destilované vody a tato kádinka byla vložena do ultrazvukové lázně na 15 minut. Ultrazvuk tuto tabletu

dokonale rozbil a obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Do této baňky bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou na objem 50,00 ml. Takto připravený roztok byl přefiltrován přes filtrační papír a následně přes filtry Minisart RC 15 s póry o průměru 0,45 nm. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 1,00 ml do 10,00 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku byly pipetovány do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 3,10 ml.

3. Cernevit: lyofilizovaný obsah ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Do této baňky bylo přidáno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem. Z této baňky bylo pipetováno 1,00 ml do 10,00 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku byl pipetován do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 1,00 ml.
4. Soluvit N: lyofilizovaný obsah jedné ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky, do které bylo následně pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 1,00 ml do 10,00 ml odměrné baňky doplněné destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku byl pipetován do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 1,00 ml.
5. Sanostol: sirup byl odměřen do 10,00 ml odměrné baňky až po rysku, tento objem byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Po přídatku 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny a doplnění po rysku destilovanou vodou, byla vzniklá směs přefiltrována přes fritu S3 s pomocí podtlaku. Z filtrátu byly pipetovány do odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku 0,20 ml.

Při metodě standardního přídatku bylo používáno vždy šest roztoků kalibrační řady. Do každé odměrné baňky o objemu 10,00 ml byl pipetován jiný objem zásobního roztoku riboflavinu. První baňka sloužila jako slepý pokus a zásobní roztok riboflavinu

neobsahovala. Následující baňky obsahovaly zásobní roztok riboflavinu o objemu 0,02, 0,04, 0,10, 0,14 a 0,16 ml. Do všech odměrných baněk byl následně pipetován výše uvedený objem roztoku daného léčivého přípravku a 175 µl roztoku octanu sodného. Všechny baňky byly nakonec doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

Vyhodnocení

Obsah riboflavinu v léčivých přípravcích byl vypočítán z kalibrační závislosti s ohledem na ředění vzorku během měření. Následující vzorec je platný pro všechny léčivé přípravky kromě sirupu Sanostol:

$$m = |x|MV_2V_{kal.}\frac{V_{zás.}}{V_1} \quad (3.2)$$

kde m je hmotnost riboflavinu vypočítaná z rovnice kalibrační přímky v miligramech [mg], $|x|$ je absolutní hodnota molární koncentrace [M] riboflavinu v roztoku vypočtená z rovnice regrese grafu závislosti absorbance na koncentraci standardního přídatku, M je molární hmotnost riboflavinu [376,367 g mol⁻¹], $V_{kal.}$ je objem odměrné baňky kalibrační řady [ml], $V_{zás.}$ je objem odměrné baňky, do které byl připraven původní roztok léčivého přípravku [ml], V_1 je objem léčivého přípravku pipetovaný do kalibrační řady [ml] a V_2 je objem odměrné baňky sloužící k naředění původního roztoku vzorku [ml].

Pro výpočet obsahu riboflavinu v sirupu Sanostol byl použit vzorec 3.1.

3.3.3 Voltametrické stanovení

Příprava roztoků

1. Zásobní roztok riboflavinu byl připraven odvážením asi 95 mg riboflavinu přesně, který byl kvantitativně převeden do 500,0 ml odměrné baňky. Do této odměrné baňky bylo pipetováno 10,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 5,00 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou a zabalena do alobalu. Koncentrace riboflavinu v zásobním roztoku byla $5,00 \times 10^{-4}$ M.

2. Zásobní roztok hydroxidu sodného byl připraven odvážením 8,5 g hydroxidu sodného a jeho rozpuštěním ve 100 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Koncentrace hydroxidu sodného v tomto zásobním roztoku činila 2,1 M.
3. Zásobní roztok octanu sodného byl připraven navážením 0,7 g trihydrátu octanu sodného a rozpuštěním této navážky v 50 ml destilované vody v zásobní lahvičce. Octan sodný měl koncentraci 0,10 M.
4. Zásobní roztok chloridu draselného byl připraven odvážením 3,73 g pevného chloridu draselného a rozpuštěním této navážky v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 500,0 ml. Koncentrace tohoto zásobního roztoku činila 0,10 M.

Stanovení

K voltametrickému stanovení byl použit potenciostat EZstat-pro, ver. 3.0 (NuVant Systems). Voltametrická cela se skládala z pracovní, referenční a pomocné elektrody, bylo tedy použito tříelektrodové zapojení. Pracovní elektrodou byla elektroda tuhá rotující disková platinová ($A = 14,0 \text{ mm}^2$; $d = 4,22 \text{ mm}$), referenční elektrodou argentchloridová a pomocnou platinová. Měření intenzity elektrického proudu probíhalo v potenciálovém rozmezí od $-0,4 \text{ V}$ do $-1,2 \text{ V}$, rychlost polarizace elektrod byla nastavena na hodnotu 10 mV/s . Koncentrace každého léčivého přípravku v kalibrační řadě měla hodnotu $3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Stanovení obsahu riboflavinu v jednotlivých lékových formách bylo provedeno metodou standardního přídatku, k sestrojení kalibrační křivky byly použity hodnoty proudů odečtených z jednotlivých voltametrických vln. Přípravy roztoků analyzovaných léčivých přípravků byly následující:

1. Riboflavin Generica: jedna tableta byla umístěna do 50,00 ml odměrné baňky, do které bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 0,60 ml.
2. Duovit: jedna tableta byla umístěna do kádinky s trochou destilované vody a tato kádinka byla vložena do ultrazvukové lázně na 15 minut. Ultrazvuk tuto tabletu dokonale rozbil a obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Do této baňky bylo pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml

- octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou na objem 50,00 ml. Takto připravený roztok byl přefiltrován přes filtrační papír a následně přes filtry Minisart RC 15 s póry o průměru 0,45 nm. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 4,70 ml.
3. Cernevit: lyofilizovaný obsah ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Do této baňky bylo přidáno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny, baňka byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 1,40 ml.
 4. Sanostol: sirup byl odměřen do 10,00 ml odměrné baňky až po rysku, tento objem byl kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky. Po přidavku 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny a doplnění po rysku destilovanou vodou, byla vzniklá směs přefiltrována přes fritu S3 s pomocí podtlaku. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 2,80 ml.
 5. Soluvit N: lyofilizovaný obsah jedné ampule byl zhomogenizován a kvantitativně převeden do 50,00 ml odměrné baňky, do které bylo následně pipetováno 1,00 ml 2,1 M hydroxidu sodného a 0,50 ml octové kyseliny. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku se do jednotlivých odměrných baněk při stanovení metodou standardního přídatku pipetovalo 1,60 ml.

Při metodě standardního přídatku bylo používáno vždy šest roztoků kalibrační řady. Do každé odměrné baňky o objemu 10,00 ml byl pipetován jiný objem zásobního roztoku riboflavinu. První baňka sloužila jako slepý pokus a zásobní roztok riboflavinu neobsahovala. Následující baňky obsahovaly zásobní roztok riboflavinu o objemu 0,00, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 a 0,50 ml. Do všech odměrných baněk byl následně pipetován výše uvedený objem roztoku daného léčivého přípravku a 175 μ l roztoku octanu sodného. Všechny baňky byly nakonec doplněny po rysku připraveným roztokem chloridu draselného sloužícího jako základní elektrolyt a promíchány.

Vyhodnocení

Obsah riboflavinu v léčivých přípravcích byl vypočítán z kalibrační závislosti příslušných hodnot proudů přiřazených k daným koncentracím. Výpočet obsahu riboflavinu se řídil podle vzorce 3.1.

3.4 Statistické zpracování naměřených hodnot

Všechna data získaná během měření byla statisticky zpracována pomocí softwarových programů OriginPro 7.0 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA) na hladině významnosti 0,95 za použití běžných statistických postupů.

Všechny výsledky byly získány metodou kalibrace se standardním přídávkem. Výsledek každého stanovení je hodnota x_E , jenž byla odečtena ze získané kalibrační přímky. Interval spolehlivosti byl vypočítán jako násobek standardní odchylky s odečtené z kalibrační přímky a z kritické hodnoty Studentova t -testu, tedy $x_E \pm ts$. Hodnota standardní odchylky patřící k hodnotě odečtené z kalibrační přímky byla vypočítána podle rovnice

$$s = \frac{s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3.3)$$

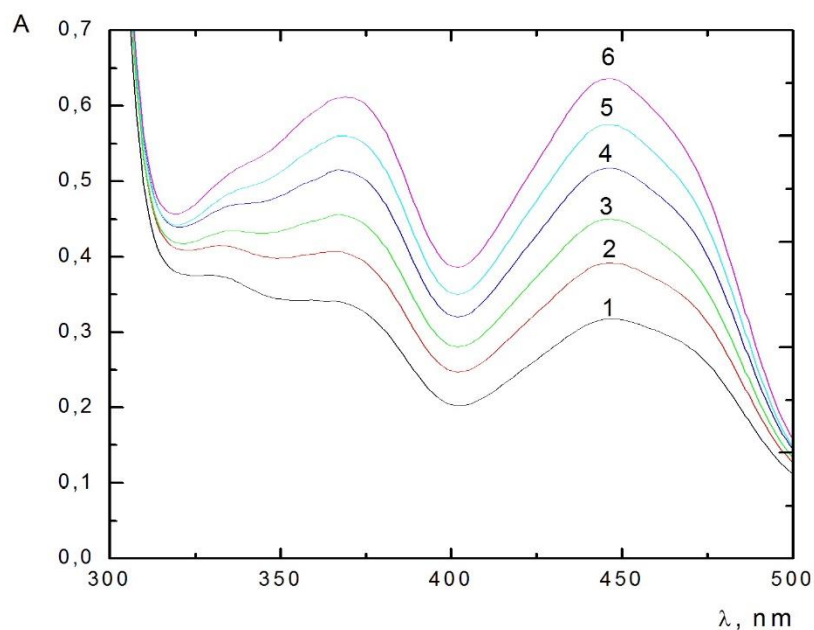
kde $s_{x/y}$ je standardní odchylka lineární regrese kalibrační přímky, b je směrnice této lineární regrese, n je počet bodů kalibrační přímky, \bar{y} průměr naměřených hodnot závislých proměnných, x_i hodnoty nezávislé proměnné a \bar{x} průměr naměřených hodnot nezávislých proměnných.

4 Výsledky a diskuze

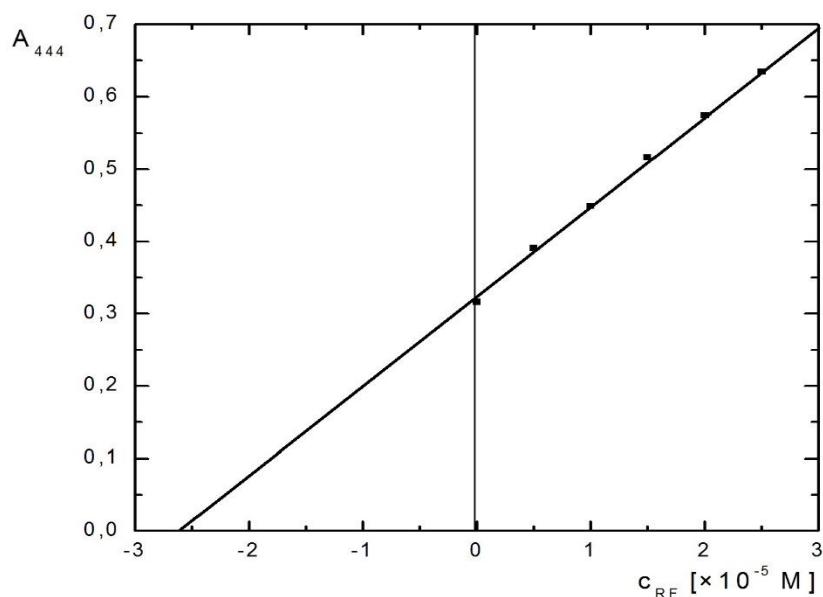
4.1 Spektrofotometrické stanovení v UV/VIS oblasti

Spektrofotometrické stanovení obsahu riboflavinu v UV/VIS oblasti bylo možné provést u všech analyzovaných léčivých přípravků. Pro přípravek Riboflavin Generica a sirup Sanostol byla provedena celkem tři stanovení, pro Cernevit a Soluvit N čtyři stanovení a pro Duovit celkem pět stanovení.

Na obr. 4.1 je znázorněn průběh UV/VIS absorpčního spektra při třetím spektrofotometrickém stanovení riboflavinu v přípravku Duovit. Závislost absorbance při 444 nm na koncentraci standardního přídatku riboflavinu při třetím spektrofotometrickém stanovení riboflavinu v přípravku Duovit je znázorněna na obr. 4.2.



Obr. 4.1. Absorpční spektrum riboflavinu v UV/VIS oblasti během třetího stanovení v přípravku Duovit ($c_{\text{riboflavin}} = 1,2 \text{ mg/tbt}$; $l = 1 \text{ cm}$) metodou standardního přídavku: (1) ředěný vzorek bez přídavku, (2) ředěný vzorek s přídavkem 0,10 ml zásobního roztoku riboflavinu, (3) ředěný vzorek s přídavkem 0,20 ml zásobního roztoku riboflavinu, (4) ředěný vzorek s přídavkem 0,30 ml zásobního roztoku riboflavinu, (5) ředěný vzorek s přídavkem 0,40 ml zásobního roztoku riboflavinu a (6) ředěný vzorek s přídavkem 0,50 ml zásobního roztoku riboflavinu.



Obr. 4.2. Závislost absorbance při 444 nm na koncentraci standardního přídavku riboflavinu při třetím stanovení riboflavinu v léku Duovit ($l = 1 \text{ cm}$).

Odečtené koncentrace riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích z kalibračních přímk, odpovídající hmotnosti riboflavinu a obsah riboflavinu v procentech deklarovaného obsahu uvádí tab. 4.1. Žádný výsledek nebyl podle Deanova-Dixonova testu vyloučen jako odlehlý. V přípravku Riboflavin Generica byl obsah riboflavinu v procentech deklarovaného obsahu stanoven na 95 ± 10 %, v Sanostolu na 112 ± 25 %, v Cernevitu na $103 \pm 6,5$ %, v Soluvitu N na 103 ± 19 % a v Duovitu na $110 \pm 9,1$ %.

Tab. 4.1.

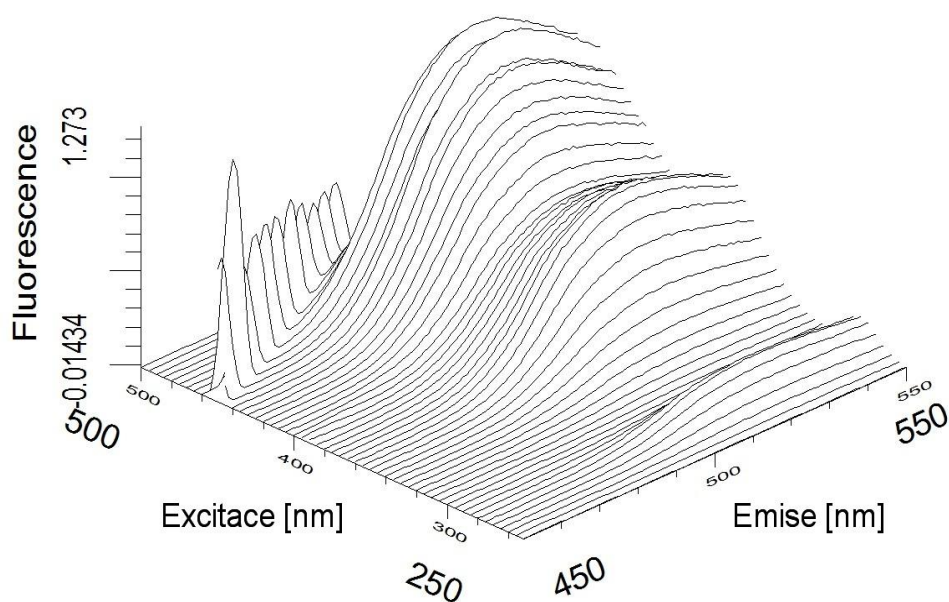
Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích metodou UV/VIS spektrofotometrie. Změřená koncentrace riboflavinu při metodě standardního přídavku, vypočítaná hmotnost riboflavinu v analyzovaném vzorku a obsah riboflavinu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

vzorek, deklarovaný obsah	stanovení	$c_{RF} [10^{-5} \text{ M}]$	$m_{RF} [\text{mg}]$	$w_{RF} [\%]$
Riboflavin Generica (10 mg/tbt)	1.	2,5	9,5	94,7
	2.	2,7	10,1	100,6
	3.	2,5	9,3	92,9
Sanostol (2 mg/10 ml)	1.	4,0	1,9	94,1
	2.	4,8	2,5	112,3
	3.	4,8	2,3	113,5
Cernevit (4,14 mg/ampule)	1.	2,3	4,2	102,3
	2.	2,2	4,0	97,6
	3.	2,3	4,3	104,6
	4.	2,3	4,4	106,6
Soluvit N (3,6 mg/ampule)	1.	2,3	3,7	101,3
	2.	2,4	3,8	104,4
	3.	2,0	3,1	86,6
	4.	2,6	4,1	112,5
Duovit (1,2 mg/tbt)	1.	2,8	1,3	110,0
	2.	3,0	1,4	117,9
	3.	2,6	1,2	100,1
	4.	2,7	1,3	106,9
	5.	2,8	1,3	110,2

4.2 Spektrofluorimetrické stanovení

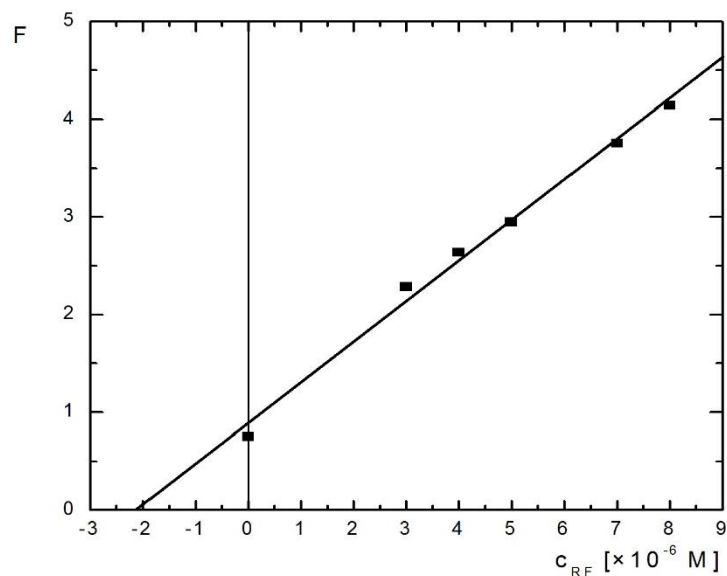
Spektrofluorimetrické stanovení obsahu riboflavinu bylo možné provést u všech analyzovaných léčivých přípravků. Pro přípravky Duovit a sirup Sanostol byla provedena celkem tři stanovení a pro Riboflavin Generica, Cernevit a Soluvit N čtyři stanovení.

Před vlastním stanovením bylo provedeno změření optimální excitační a emisní vlnové délky pro stanovení proměřením roztoku standardu riboflavinu v rozsahu excitačních vlnových délek od 250 nm do 500 nm a emisních vlnových délek od 450 nm do 500 nm (obr. 4.3). Z tohoto měření byla pro stanovení zvolena excitační vlnová délka 465 nm a emisní vlnová délka při 525 nm.



Obr. 4.3. Závislost intenzity fluorescence na vlnových délkách excitace, resp. emise, pro roztok standardu riboflavinu o koncentraci 1×10^{-6} M.

Na obr. 4.4 je znázorněna závislost intenzity fluorescence při hodnotě vlnové délky excitačního záření 465 nm a hodnotě vlnové délky emisního záření 525 nm na koncentraci standardního přídatku riboflavinu během třetího stanovení riboflavinu v sirupu Sanostol.



Obr. 4.4. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci standardního přídávku riboflavinu při třetím stanovení riboflavinu v sirupu Sanostol ($l = 1 \text{ cm}$).

Odečtené koncentrace riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích z kalibračních přímek, odpovídající hmotnosti riboflavinu a obsah riboflavinu v procentech deklarovaného obsahu uvádí tab. 4.2. Podle Deanova-Dixonova testu byly vyloučeny dva výsledky jako odlehlé: první stanovení u sirupu Sanostol a poslední stanovení u léku Soluvit N. V přípravku Riboflavin Generica byl obsah riboflavinu v procentech deklarovaného obsahu stanoven na $107 \pm 9,4 \%$, v Sanostolu na $100 \pm 0,0 \%$, v Cernevitu na $108 \pm 23 \%$, v Soluvitu N na $124 \pm 1,2 \%$ a v Duovitu na $121 \pm 5,1 \%$.

Tab. 4.2.

Výsledky spektrofotometrického stanovení obsahu riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích. Změřená koncentrace riboflavinu při metodě standardního přídatku, vypočítaná hmotnost riboflavinu v analyzovaném vzorku a obsah riboflavinu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

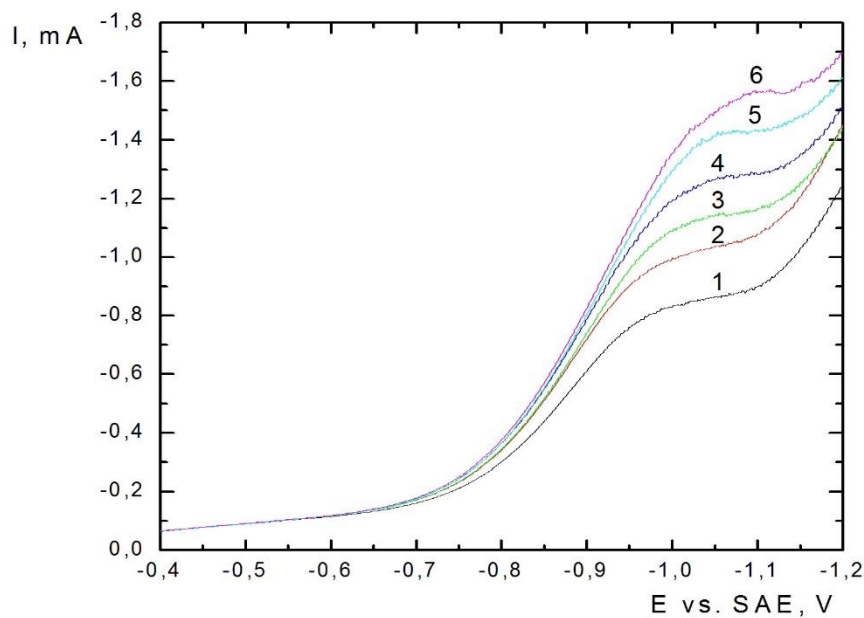
vzorek, deklarovaný obsah	stanovení	$c_{RF} [10^{-6} \text{ M}]$	$m_{RF} [\text{mg}]$	$w_{RF} [\%]$
Riboflavin Generica (10 mg/tbt)	1.	2,2	10,4	103,6
	2.	2,5	11,6	115,9
	3.	2,2	10,3	102,8
	4.	2,4	11,1	110,7
Sanostol (2 mg/10 ml)	1. ^a	2,2	2,1	104,6
	2.	2,1	2,0	99,9
	3.	2,1	2,0	100,0
Cernevit (4,14 mg/ampule)	1.	2,8	5,3	126,7
	2.	2,3	4,3	104,9
	3.	2,1	3,9	94,8
	4.	2,4	4,6	110,0
Soluvit N (3,6 mg/ampule)	1.	2,4	4,4	123,0
	2.	2,4	4,5	123,8
	3.	2,4	4,5	123,9
	4. ^a	2,2	4,2	117,2
Duovit (1,2 mg/tbt)	1.	2,4	1,5	121,9
	2.	2,4	1,5	121,2
	3.	2,3	1,4	118,0

^a Stanovení vyloučeno jako odlehle podle Deanova-Dixonova testu.

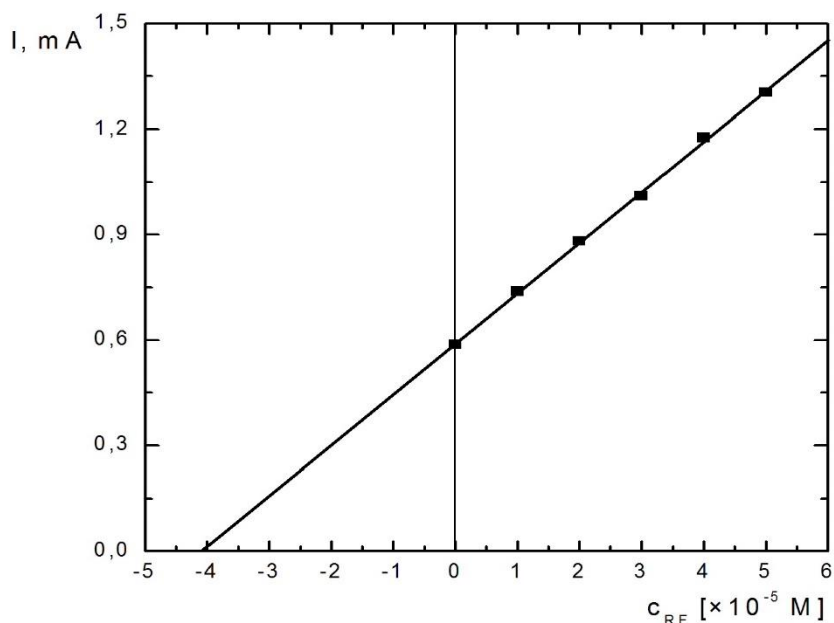
4.3 Voltametrické stanovení

Voltametrické stanovení obsahu riboflavinu bylo možné provést pouze v léčivech Riboflavin Generica a Cernevit, avšak výsledky těchto stanovení jsou značně nadhodnoceny vlivem dalších látek, které tyto lékové formy obsahovaly. Ve zbylých analyzovaných přípravcích nebylo voltametrické stanovení vůbec možné také vlivem komplexních matic, navíc nebyl v příslušných voltamogramech zaznamenán žádný skok na polarizační křivce, který by indikoval vznik redukované formy riboflavinu.

Na obr. 4.5 je znázorněn průběh jednotlivých polarizačních křivek při třetím voltametrickém stanovení riboflavinu v léku Riboflavin Generica metodou standardního přídávku. V grafu 4.6 je znázorněna závislost limitního difuzního proudu voltametrické vlny riboflavinu na koncentraci standardního přídávku riboflavinu při třetím voltametrickém stanovení riboflavinu v léku Riboflavin Generica.



Obr. 4.5. Polarizační křivky riboflavinu během třetího stanovení riboflavinu v léčivu Riboflavin Generica metodou standardního přídávku: (1) ředěný vzorek bez přídávku, (2) ředěný vzorek s přídávkem 0,10 ml zásobního roztoku riboflavinu, (3) ředěný vzorek s přídávkem 0,20 ml zásobního roztoku riboflavinu, (4) ředěný vzorek s přídávkem 0,30 ml zásobního roztoku riboflavinu, (5) ředěný vzorek s přídávkem 0,40 ml zásobního roztoku riboflavinu a (6) ředěný vzorek s přídávkem 0,50 ml zásobního roztoku riboflavinu.



Obr. 4.6 Závislost limitního difuzního proudu voltametrické vlny riboflavinu na koncentraci standardního přídávku riboflavinu při třetím stanovení riboflavinu v přípravku Riboflavin Generica.

Odečtené koncentrace riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích z kalibračních přímek, odpovídající hmotnosti riboflavinu a obsah riboflavinu v procentech deklarovaného obsahu uvádí tab. 4.3. Byla provedena celkem tři stanovení pro lék Riboflavin Generica a Cernevit, ze kterých Deanův-Dixonův test nevyloučil žádný výsledek jako odlehlý. V přípravku Riboflavin Generica byl obsah riboflavinu stanoven v procentech deklarovaného obsahu na $160 \pm 72 \%$ a v Cernevitu na $397 \pm 160 \%$.

Tab. 4.3.

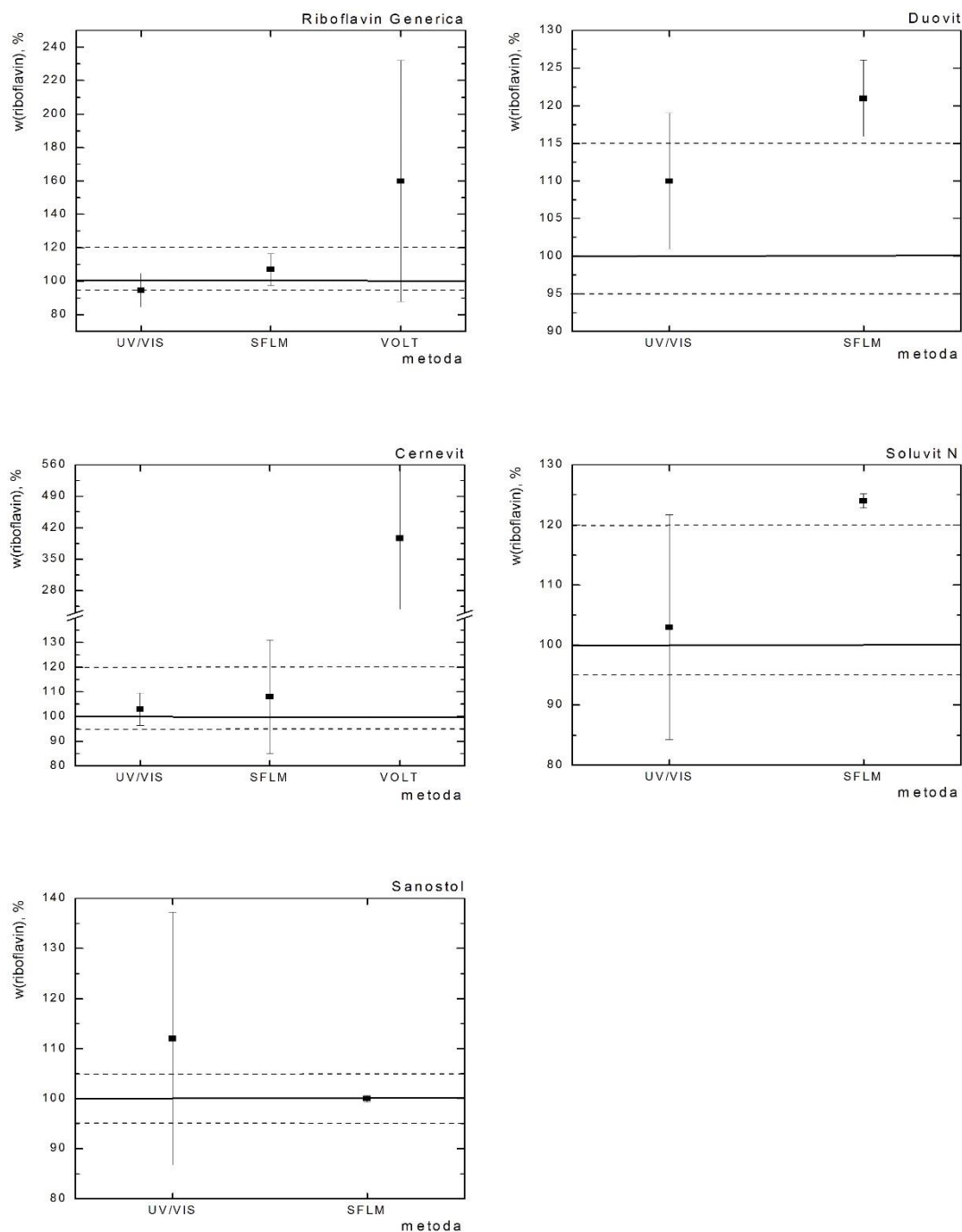
Výsledky voltametrického stanovení obsahu riboflavinu v analyzovaných léčivých přípravcích. Změřená koncentrace riboflavinu při metodě standardního přídávku, vypočítaná hmotnost riboflavinu v analyzovaném vzorku a obsah riboflavinu v analyzovaném vzorku v procentech deklarovaného obsahu.

vzorek, deklarovaný obsah	stanovení	$c_{RF} [10^{-4} \text{ M}]$	$m_{RF} [\text{mg}]$	$w_{RF} [\%]$
Riboflavin Generica (10 mg/tbt)	1.	0,59	18,5	184,5
	2.	0,51	16,0	160,0
	3.	0,41	12,9	129,1
Cernevit (4,14 mg/ampule)	1.	1,2	16,5	397,3
	2.	1,0	13,6	329,3
	3.	1,4	18,7	451,2

4.4 Vyhodnocení preciznosti, pravdivosti a dalších aspektů vybraných metod pro stanovení riboflavinu

Pravdivosti stanovení pro jednotlivé léčivé přípravky byly porovnány pouze graficky jako těsnosti shod mezi vypočítanými mediány a referenčními hodnotami určené podle [23]. Stanovení je tedy pravdivé, jestliže v obr. 4.7 leží medián daného měření (černý čtverec) ve vyznačených referenčních mezích (čárkované přímky). Preciznosti stanovení jsou porovnány také graficky jako těsnosti shod mezi naměřenými veličinami na stejném objektu za stejných podmínek. Stanovení lze považovat za precizní, jestliže v grafu 4.7 je délka chybové úsečky, která je reprezentována jako interval spolehlivosti, co nejmenší. Podle [23] se obsah riboflavinu v tabletách může pohybovat v rozmezí od 95,0 % do 115,0 % a v léčivech pro přípravu injekčních roztoků od 95,0 % do 120,0 %. Hodnoty horních mezí jsou oproti standardním mezím (95,0% až 105,0%) vyšší z důvodu fyziologické nemožnosti předávkovat se riboflavinem. Standardní meze obsahu látky v léčivém přípravku byla aplikována na sirup Sanostol.

Z obr. 4.7 je patrné, že nejpravdivější metodou pro stanovení riboflavinu je metoda spektrofotometrického stanovení v UV/VIS oblasti, neboť pouze hodnota mediánu u stanovení riboflavinu v sirupu Sanostol neleží v referenčních mezích. U spektrofluorimetrického stanovení v referenčních mezích neleží celkem dva mediány, a to u stanovení riboflavinu v tabletách Duovit a lyofilizátu Soluvit N. Na druhou stranu nejpreciznější měření poskytlo právě spektrofluorimetrické měření u sirupu Sanostol následované lyofilizátem Soluvitem N. Nejméně vhodnou metodou se stala metoda voltametrického stanovení, které bylo provedeno pouze u léčiv Riboflavin Generica a Cernevit. Preciznost voltametrického stanovení riboflavinu v léčivu Riboflavin Generica alespoň zasahuje do určujících referenčních mezí, stanovení riboflavinu v Cernevitu je jak nepravdivé, tak i neprecizní. Důvodem takto špatného výsledku je pravděpodobně složitá matrice samotného léčivého přípravku, která mohla během tohoto stanovení interferovat. Vliv matrice se dále pravděpodobně projevil i u spektrofotometrického stanovení v UV/VIS oblasti u všech léčiv kromě Riboflavin Generica. Složitá matrice Duovitu, Cernevitu, Soluvitu N a Sanostolu mohla zapříčinit vyšší hodnoty obsahu riboflavinu (s nepřihlédnutím na preciznost stanovení).



Obr. 4.7. Porovnání výsledků jednotlivých stanovení danými metodami (spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, spektrofluorimetrie, voltametrie) pro analyzované léčivé přípravky obsahující riboflavin: tablety Riboflavin Generica (10 mg/tbt) a Duovit (1,2 mg/tbt), lyofilizáty pro přípravu injekčních roztoků Cernevit (4,14 mg/ampule) a Soluvit N (3,6 mg/ampule) a sirup Sanostol (2 mg/10ml). Výsledky jsou zobrazeny jako mediány stanovených množství riboflavinu s vyznačenými intervaly spolehlivosti. Silná plná čára vyznačuje deklarovaný obsah riboflavinu, čárkované čáry označují horní a dolní mez obsahu riboflavinu v daných lékových formách podle [23].

Časově nejnáročnější metodou, tj. čas potřebný k přípravě kalibrační řady s následným proměřením všech vzorků kalibrační řady, se stala voltametrie. Samotná příprava kalibračních řad probíhala u všech vybraných metod principiálně stejně, nicméně následné proměřování jednotlivých vzorků se lišilo. U voltametrického stanovení bylo potřeba celkem 45 sekund na poměření polarizační křivky v celém rozsahu u jednoho roztoku léčivého přípravku v kalibrační řadě. U spektrofluorimetrického stanovení činil tento čas 11 sekund, u spektrofotometrického stanovení v UV/VIS oblasti zhruba 4 sekundy.

4.5 Použití dalších metod pro stanovení riboflavinu

Mimo jiné byly zkoušeny i další metody stanovení riboflavinu v léčivých přípravcích, především metody absolutní, tedy titrační. Existuje několik pojednání o titračním stanovení riboflavinu [24, 25]. Hodnoty získané z nepřímého jodometrického stanovení riboflavinu hrubě neodpovídaly vypočteným a předpokládaným hodnotám. Druhá titrace, komplexometrické stanovení riboflavinu, nebyla z důvodu časové náročnosti prováděna vůbec. Nebylo ani možné provést coulometrickou titraci, neboť se riboflavin nacházel ve všech vzorcích v oxidované formě.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat celkem tři vybrané analytické metody pro stanovení riboflavinu v pěti léčivých přípravcích z hlediska preciznosti, pravdivosti a časové náročnosti.

Pro stanovení riboflavinu byly vybrány metody: spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, spektrofluorimetrie a voltametrie. Nejpravdivější výsledky poskytla metoda spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, pravým opakem se stalo voltametrické stanovení, jenž bylo proveditelné pouze na dvou léčivých přípravcích (Riboflavin Generica a Cernevit), výsledky stanovení byly navíc velmi nadhodnoceny. U léčivého přípravku Cernevit lze voltametrické stanovení považovat za neprecizní a nepravdivé. Vzhledem k tomu, že Cernevit je oproti Riboflavinu Generica léčivý přípravek s komplexní matricí, může tento fakt vést k potvrzení domněnky, že zbylá voltametrická stanovení nebyla možné provést právě z důvodu obsahu mnoha dalších látek ve zbylých léčivech. Výsledky s nejvyšší precizností poskytla metoda spektrofluorimetrie i přes menší pravdivost výsledků než u metody spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.

Časově nejnáročnější metodou se stala metoda voltametrického stanovení, naopak nejméně času k analýze bylo potřeba u spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.

Literatura

- [1] *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications.* F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo (eds.). Blackwell Publishing 2010.
- [2] <http://glascoed.com/html/alexanderwynterblyth.html>
- [3] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1931/warburg-bio.html
- [4] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/themes/medicine/states/richard-kuhn.html
- [5] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1937/karrer-bio.html
- [6] *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material.* 4th Ed. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, J. Watts (eds.) Pharmaceutical Press, 2011.
- [7] *Český lékopis* 2009. Praha, Grada 2009.
- [8] Zielenkiewicz W., Terekhova I.V., Kozbial M., Kumeev R.S.: Thermodynamic study on inclusion complex formation of riboflavin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **101** (2010), 595–600.
- [9] Matouš B. a kol.: *Základy lékařské chemie a biochemie.* Praha, Galén 2010.
- [10] Rivlin R. S.: Riboflavin (Vitamin B₂). In: *Handbook of Vitamins.* Zempleni J., Rucker R. B., McCormick D. B., Suttie J. W.. 4th. ed. Boca Raton, CRC Press 2007, s. 233–251.
- [11] McDowell, L. R.: *Vitamins in Animal and Human Nutrition.* 2nd ed. Iowa, Iowa State University Press 2000, s. 311–346.
- [12] Food and Nutrition Board and National Research Council: *Recommended Dietary Allowances,* 10th ed. Washington DC, National Academy Press 1989, s. 132–137.
- [13] Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie.* Praha, VŠCHT 2002, s. 366–367.
- [14] Shiu K.-K., Shi K.: Selective determination of vitamin B₂ at electrochemically activated glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **12** (2000), 134–139.
- [15] Wang J., Luo D.-B., Farias P. A. M., Mahmoud J. S.: Adsorptive stripping voltammetry of riboflavin and other flavin analogues at the static mercury drop electrode. *Analytical Chemistry* **57** (1985), 158–162.
- [16] Bas B., Jakubowska M., Górski L.: Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B₁ and B₂. *Talanta* **84** (2011), 1032–1037.
- [17] Economou A., Fielden P. R.: A study of riboflavin determination by square wave adsorptive stripping voltammetry on mercury film electrodes. *Electroanalysis* **12** (2000), 447–453.

- [18] Mohamed A.-M. I., Mohamed H. A., Mohamed N. A., El-Zahery M. R.: Chemometric methods for the simultaneous determination of some water-soluble vitamins. *Journal of AOAC International* **94** (2011), 467–481.
- [19] Pieszko C., Baranowska I., Flores A.: Determination of energizers in energy drinks. *Journal of Analytical Chemistry* **65** (2010), 1228–1234.
- [20] Fotsing L., Fillet M., Bechet I., Hubert Ph., Crommen J.: Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15** (1997), 1113–1123.
- [21] García L., Blázquez S., San Andrés M. P., Vera S.: Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. *Analytica Chimica Acta* **434** (2001), 193–199.
- [22] Viñas P., Balsalobre N., López-Erroz C., Hernández-Córdoba M.: Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (2004), 1789–1794.
- [23] *The United States Pharmacopeia 37*. Rockville, United States Pharmacopoeial Convention 2014.
- [24] Koka I. P., Koltun P. S.: Jodometrične viznačennja riboflavinu, metiluracilu i rutinu v dějakich likarskich sumišach. *Farmaceutičnij žurnal* (1986), 64–65. **CA** 105:158950.
- [25] Gajewska M., Szrajber Z.: Kompleksometryczne oznaczanie niektórych witamin z zastosowaniem pikrynianow metali. *Chemia Analityczna* **20** (1975), 99–106.